

УДК 576.893.161.13:59.086

© 1991

ОПИСАНИЕ LEPTOMONAS MYCOPHILUS SP. N. (TRYPANOSOMATIDAE) — ПАРАЗИТА КЛОПА PHYTOCORIS SP. (MIRIDAE)**А. О. Фролов, С. О. Скарлато**

Приводится свето- и электронно-микроскопическое описание нового вида трипаносоматид — *Leptomonas mycophilus*. Этот вид жгутиконосцев был выделен из кишечника личинок клопа *Phytocoris* sp. Обсуждаются особенности культивирования *L. mycophilus*.

Около половины известных видов низших трипаносоматид описаны из полужесткокрылых насекомых (Wallace, 1966). Вместе с тем фауна трипаносоматид, паразитирующих в клопах, изучена еще крайне неудовлетворительно. Например, среди представителей одного из крупнейших семейств полужесткокрылых *Miridae*, объединяющего около 800 родов и несколько тысяч видов клопов-слепняков (Кержнер, Ячевский, 1964), к настоящему времени исследовано всего около 20 видов насекомых, в которых найдены два представителя рода *Leptomonas* и *Blastocrithidia miridarum* (Robertson, 1912; Подлипаев, Фролов, 1987). Недостаточная изученность фауны низших трипаносоматид существенно тормозит понимание эволюции и филогении этого важного в практическом отношении семейства паразитических жгутиконосцев.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Личинки клопов *Phytocoris* sp. были собраны со стволов старых елей в окрестностях пос. Сосново Ленинградской обл. в конце июня 1988 г. В средней и задней кишке двух особей насекомых обнаружены низшие трипаносоматиды. Методика получения лабораторных культур трипаносоматид из клопов и их ведения на жидкой и плотной средах КГДЭ описана ранее (Подлипаев, 1985; Подлипаев, Фролов, 1987). В световом микроскопе морфологию жгутиконосцев из кишечника насекомых, а также с жидкой и твердой питательных сред, изучали на препаратах, окрашенных по Романовскому-Гимза. Для электронной микроскопии суспензию клеток осаждали центрифугированием из жидкой культуральной среды. Полученный осадок фиксировали холодным 1.5%-ным глутаральдегидом в 0.1 М какодилатном буфере, постфиксировали холодным 2%-ным OsO_4 , обезвоживали и заливали в смесь эпон с аралдитом. Срезы готовили на ультрамикротоме LKB-III, окрашивали насыщенным водным раствором уранил-ацетата и цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе JEM-100CX.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ***Leptomonas mycophilus* Frolov et Skarlato sp. n.**

Х о з я и н: *Phytocoris* sp. (Heteroptera, Miridae).
Локализация в хозяине: кишечник.

Место находки: Ленинградская обл., пос. Сосново.

Культура: шифр SV-69, выделена 26.06.1988 из 1 экз. хозяина.

Типы: синтип, паратип, ксенотип и типовая культура SV-69 хранятся в лаборатории протозоологии ЗИН АН СССР.

Диагноз: в кишечнике хозяина представлен промастиготами; тело ланцетовидное, передний конец клетки слегка расширен; значения морфологических признаков представлены в таблице.

Дифференциальный диагноз: *L. mycophilus* (рис. 1, 1—3; см. вкл.) — первый представитель рода *Leptomonas*, описанный из клопов сем. Miridae. Отсутствие описаний двух других видов лептомонад, обнаруженных ранее в клопах-слепнях из Уганды и СССР (Robertson, 1912; Подлипаев, Фролов, 1987), не позволяет провести их сравнение с *L. mycophilus*. Наибольшее сходство *L. mycophilus* имеет с *L. nabicula* и *L. peterhoffi* из хищных клопов *Nabicula flavomarginata* (сем. Nabidae). Однако последние два вида лептомонад хорошо отличаются от *L. mycophilus* размерами и рядом других признаков (Подлипаев, 1985; Малышева, Скарлато, 1989).

При посеве на жидкую питательную среду КГДЭ содержимого кишечника зараженной особи *Phytocoris* sp. был получен штамм *L. mycophilus*, названный SV-69. Последний оказался контаминированным мицелием плесневого гриба неизвестной видовой принадлежности. Используя прибор для очистки культур (Подлипаев, Фролов, 1987), неоднократно удавалось получать аксеничные культуры этих жгутиконосцев. Однако давая нормальный рост при первом пересеве из прибора, аксеничные культуры этих жгутиконосцев неизбежно погибали при повторных пересевах. Зараженные грибом культуры лептомонад нормально размножались, достигали стационарной фазы роста при концентрации 10^6 клеток/мл и успешно пересевались через каждые 7—10 сут. Таким образом, прослеживается явная зависимость жгутиконосцев от присутствия в культуре плесневого гриба.

Мы решили проверить, обязательно ли присутствие в культуральной среде живого гриба для нормального роста *L. mycophilus*. Предварительно была получена аксеничная культура этого гриба. Далее был приготовлен отвар из гриба и добавлен к среде КГДЭ. Оказалось, что на среде с грибковым отваром *L. mycophilus* прекрасно размножались и образовывали хорошие пересеваемые культуры. К настоящему времени культура *L. mycophilus* ведется на среде КГДЭ с добавкой грибкового отвара и при пересевах через каждые 10 сут уже в течение года.

Нами было проведено сравнительное светооптическое исследование *L. mycophilus* из кишечника клопов и из культур, ведущихся на жидкой питательной среде (рис. 1, 1—5). Оказалось, что перевод жгутиконосцев из кишечника в

Морфологические признаки *Leptomonas mycophilus*

Morphological characters of *Leptomonas mycophilus*

Жгутиконосцы	Значения признаков: $\bar{X} \pm s_x$, мкм							
	Д	ПК	КЯ	ПЯ	ЯЗ	Я	Ш	Ж
Из кишечника хозяина	17.62 ± 0.76	3.06 ± 0.06	2.21 ± 0.12	5.58 ± 0.14	9.80 ± 0.62	2.26 ± 0.10	2.20 ± 0.05	21.0
Из штамма SV-69, жидкая среда	7.93 ± 0.26	3.17 ± 0.07	0	3.23 ± 0.08	2.55 ± 0.16	2.13 ± 0.07	2.35 ± 0.06	7.0
Из штамма SV-69cf, колонии на плотной среде (7 сут)	6.97 ± 0.19	2.77 ± 0.06	0	2.81 ± 0.10	2.28 ± 0.11	1.88 ± 0.07	2.66 ± 0.10	2.5
								141.5 ± 17.0

Примечание. Д — общая длина клетки; ПК — расстояние от переднего конца клетки до кинетопласта; ПЯ — расстояние от переднего конца клетки до ядра; КЯ — расстояние от кинетопласта до ядра; ЯЗ — расстояние от заднего конца клетки до ядра; Я — величина продольной оси ядра; Ш — ширина клетки; Ж — длина жгутика; ϕ — диаметр колоний на плотной среде.

культуру сопровождался существенными изменениями их морфологии (см. таблицу). Клетки становились короче и шире, происходило сближение ядра и кинетопласта. Иными словами, промастиготы *L. mycophilus* постепенно трансформировались в хоаномастиготоподобные формы (сравни рис. 1, 1—4, 5). Факт такого рода изменений морфологии лептомонад при их переводе в культуру хорошо известен (Подлипаев, 1985; Подлипаев, Фролов, 1987), однако пока он не имеет удовлетворительного объяснения и существенно осложняет трактовку родовых признаков у трипаносоматид.

На плотной агаризованной среде КГДЭ с добавлением гемина и грибкового отвара были получены полупрозрачные, бесцветные колонии *L. mycophilus*, имеющие правильную полусферическую форму (рис. 1, 7). Размер колоний представлен в таблице. Амебоидные и дендритовидные колонии, описанные наряду с полусферическими колониями у лептомонад из клопов *Nabica flavomarginata* (Подлипаев, 1985), у *L. mycophilus* не выявлены.

Как уже отмечалось выше, относительно мономорфная культура *L. mycophilus* (штамм SV-69) ведется при пересевах каждые 10 сут. Однако если эту культуру оставить без пересева в течение 30—40 сут, то среди жгутиконосцев появляются особи, морфологически идентичные формам из кишечника клопов (сравни рис. 1, 1—3, 6). В дальнейшем последние начинают составлять в культуре большинство. Эти лептомонады образуют розетковидные ассоциаты, в которых после ряда делений формируются мелкие цистоподобные эндомастиготы (рис. 1, 8—10). Пересев на этапе образования «розеток» позволяет получить стабильную «цистообразующую» культуру (штамм SV-69cf), в которой не происходит реверсий к исходному мономорфному типу культуры. Таким образом, штамм SV-69cf выщепляется из штамма SV-69 при длительном культивировании, причем в первом штамме идет образование цистоподобных эндомастигот, которые, по-видимому, являются расселительными стадиями *L. mycophilus*. Более того, промастиготы из штамма SV-69cf морфологически сходны с лептомонадами из кишечника клопов *Phytocoris* sp.

Установленные особенности культивирования *L. mycophilus* в очередной раз подчеркивают, что современные представления о жизненных циклах низших трипаносоматид пока еще плохо отражают их истинную сложность и разнообразие. Зависимость *L. mycophilus* от продуктов метаболизма плесневого гриба, выделенного вместе со жгутиконосцами из кишечника клопа, говорит в пользу сложной взаимосвязи трипаносоматид с другими компонентами флоры и фауны, населяющими организм хозяина. Такая взаимосвязь может непосредственно влиять на уровень экстенсивности инвазии жгутиносцами популяций хозяев. Она заслуживает самого пристального внимания, особенно в таких важных группах, как трипаносоматиды. Здесь уместно отметить выявленную ранее зависимость трех видов низших трипаносоматид — *Crithidia oncopelti*, *C. deanei*, *Blastocrithidia culicis* — от поступления ряда метаболитов их прокариотических эндосимбионтов (Chang, Dave, 1980; Alfieri, Camargo, 1982, и др.). Наши данные свидетельствуют о том, что трипаносоматиды могут вступать в симбиотические отношения не только с бактериями, но, по-видимому, и с грибами.

С нашей точки зрения, важна и обнаруженная у штамма SV-69 способность к выщеплению морфологически отличного штамма SV-69cf. Обычно обнаруживаемая гетерогенность природных популяций и культур многих трипаносоматид не имеет пока убедительного обоснования. Между тем если придерживаться существующих взглядов на систему Трипаносоматиде, то по своей морфологии жгутиконосцев из штамма SV-69 следует относить к роду *Crithidia*, а жгутиконосцев из штамма SV-69cf к роду *Leptomonas*. Однако генетическое единство обоих штаммов исключает такую возможность, ставя под сомнение объективность родовых критериев трипаносоматид, используемых в настоящее время.

Кроме того, в настоящем исследовании была изучена ультраструктура *L. mycophilus* из исходного штамма SV-69 (рис. 2, 1—5; см. вкл.). Тонкое строение этих лептомонад в целом оказалось сходным с таковым большинства других трипаносоматид (Vickerman, Preston, 1976; Фролов, Скарлато, 1987, 1989, и др.). Поверхность клеток *L. mycophilus* покрыта плазматической мембраной, под которой проходят субпелликулярные микротрубочки (рис. 2, 3, 4). На поперечном срезе клетки в районе ядра обычно насчитывается около 120 микротрубочек, а расстояние между соседними микротрубочками составляет 25—35 нм (рис. 2, 4). Поверхность лептомонад часто образует глубокие борозды (рис. 2, 4, 5). Более того, жгутиковый карман на переднем конце клетки обрамляют массивные складки (рис. 2, 3). Жгутиковый карман в теле клетки располагается асимметрично (рис. 2, 1). Жгутик *L. mycophilus* имеет типичное для трипаносоматид строение (рис. 2, 1, 2). В нем имеется параксиальный тяж, а В-трубочки дублетов аксономы септированы (рис. 2, 2). Цитоплазма паразитов содержит множество рибосом (рис. 2, 1). Ядро сдвинуто к переднему концу клетки (рис. 2, 1). Ядрышко обычно одно и располагается в центре ядра (рис. 2, 1, 4). В интерфазном ядре конденсированный хроматин прилегает к внутренней мембране ядерной оболочки (рис. 2, 1, 4). Митохондрия разветвлена слабо, капсула кинетопласта компактная и лежит сбоку от ядра (рис. 2, 1). Аппарат Гольджи в виде стопки уплощенных цистерн локализуется перед ядром (рис. 2, 1). Взаимное расположение этих органоидов в клетках *L. mycophilus* из штамма SV-69 весьма постоянно. В районе жгутикового кармана в цитоплазме присутствует множество пиноцитозных пузырьков (рис. 2, 1). Кроме того, в цитоплазме обнаружены гликосомы и включения липидной природы (рис. 2, 1, 4, 5). Гликосомы обычно сосредоточены в районе ядра или сразу за ним, а липидные включения накапливаются на заднем конце клетки.

Представленные данные об особенностях биологии и морфологии жгутиконосцев *L. mycophilus* подтверждают целесообразность их выделения в самостоятельный вид. Наличие лабораторных культур паразитов открывает перспективу для их дальнейшего изучения.

Список литературы

- Кержнер И. М., Ячевский Т. Л. Отряд Hemiptera (Heteroptera) — полужесткокрылые или клопы // Определитель насекомых европейской части СССР. Т. 1. М.; Л.: Наука, 1964. С. 655—845.
- Подлипаев С. А. Новые виды низших трипаносоматид из полужесткокрылых (Heteroptera) семейств Gerridae и Nabidae: стадии их жизненных циклов в природе и при культивировании в лаборатории // Тр. ЗИН АН СССР. 1985. Т. 129. С. 35—47.
- Подлипаев С. А., Фролов А. О. Описание и лабораторное культивирование *Blastocrithidia miridarum* sp. n. (Mastigophora, Trypanosomatidae) // Паразитология. 1987. Т. 21, вып. 4. С. 545—552.
- Малышева М. Н., Скарлато С. О. Исследование ультратонкой организации жгутиконосцев *Leptomonas peterhoffi*, культивируемых на жидкой и твердой питательных средах // Цитология. 1989. Т. 31, № 3. С. 267—272.
- Фролов А. О., Скарлато С. О. Свето- и электронно-микроскопические исследования *Leptomonas pyrrhocoris* Z. (Trypanosomatidae) // Паразитология. 1987. Т. 21, вып. 1. С. 3—9.
- Фролов А. О., Скарлато С. О. Электронно-микроскопическое исследование жгутиконосцев *Leptomonas jaculum* в средней кишке клопа *Nepa cinerea* // Паразитология. 1989. Т. 23, вып. 5. С. 383—389.
- Alfieri S. C., Camargo E. P. Trypanosomatidae: isoleucin requirement and threonine deaminase in species with and without endosymbionts // Exp. Parasitol. 1982. Vol. 53. P. 371—380.
- Chang K.-P., Dave C. Modulation of polyamine level and biosynthetic enzymes by bacterial endosymbionts in trypanosomatid protozoa // Endocytobiology. Endosymbiosis and cell biology. A synthesis of recent research. Berlin, N. Y.: Walter de Gruyter. 1980. Vol. 1. P. 349—359.
- Robertson M. Notes on some flagellate infections found in certain Hemiptera in Uganda // Proc. Roy. Soc., Sect. B. 1912. Vol. 85. P. 234—240.

Vickerman K., Preston T. M. Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates // Biology of Kinetoplastida. London etc.: Acad. Press, 1976. Vol. 1. P. 35—130.
Wallace F. G. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids // Exp. Parasitol. 1966. Vol. 18, N 1. P. 124—193.

ЗИН АН СССР,
Ленинград;
Институт цитологии АН СССР,
Ленинград

Поступила 23.10.1989

DESCRIPTION OF LEPTOMONAS MYCOPHILUS SP. N. (TRYPANOSOMATIDAE) FROM
THE BUG PHYTOCORIS SP. (MIRIDAE)

A. O. Frolov, S. O. Skarlato

Key words: *Leptomonas mycophilus* sp. n., cultivation, colonies, morphology, ultrastructure

SUMMARY

A new flagellate species, *Leptomonas mycophilus*, has been described from the intestine of *Phytocoris* sp. larvae. Strain SV-69 of *L. mycophilus* was isolated and put in the liquid culture medium. The medium chosen for the parasite cultivation appeared to be contaminated with a mould of unknown species. However, in the mould-free culture the flagellates failed to grow to perish eventually. In the presence of the mould decoction and at regular subculturing every 10 days a population of nearly monomorphic flagellates was seen to emerge, composed of choanomastigote-like forms. This is the more surprising that the parasites isolated from the bug intestine were promastigotes.

However, by the 30—40-day cultivation, without subculturing, a great amount of flagellates similar to the bug forms appeared in the original strain SV-69. This transformed strain was designated as strain SV-69cf. The flagellates of this strain formed rosette-like colonies with cyst-like endomastigotes inside, which might have appeared as a result of successive divisions. On the dense nutrient medium containing mould decoction *L. mycophilus* formed hemispherical colonies. *L. micophilus* from the bug and both its strains (SV-69 and SV-69cf) were studied comparatively with the light microscope, flagellates of strain SV-69 being investigated, in addition, with the electron microscope.

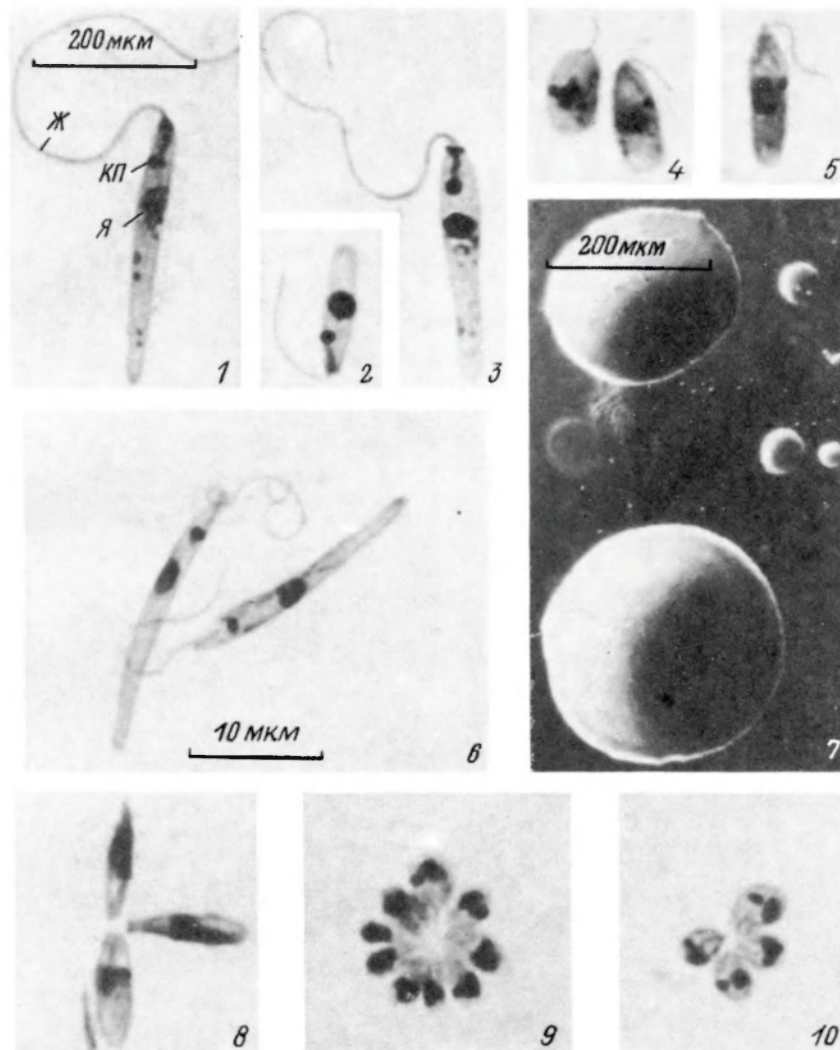


Рис. 1. Светооптическое исследование *Leptomonas mycophilus* из кишечника личинки клопа *Phytocoris* sp. и из культур.

1—3 — жгутиконосцы из кишечника клопа; 4, 5 — жгутиконосцы из исходной мономорфной культуры (штамм SV-69); 6, 8—10 — отдельные жгутиконосцы (6), розетковидные колонии (8, 9) и цистоподобные эндомастиготы (10) из штамма SV-69sf. Ж — жгутик, КП — кинетопласт; Я — ядро. Масштаб 1—5 и 8—10 — такой же, как на рис. 6.

Fig. 1. Light microscopy investigation of *Leptomonas mycophilus* from the intestine of *Phytocoris* sp. larvae and from cultures.

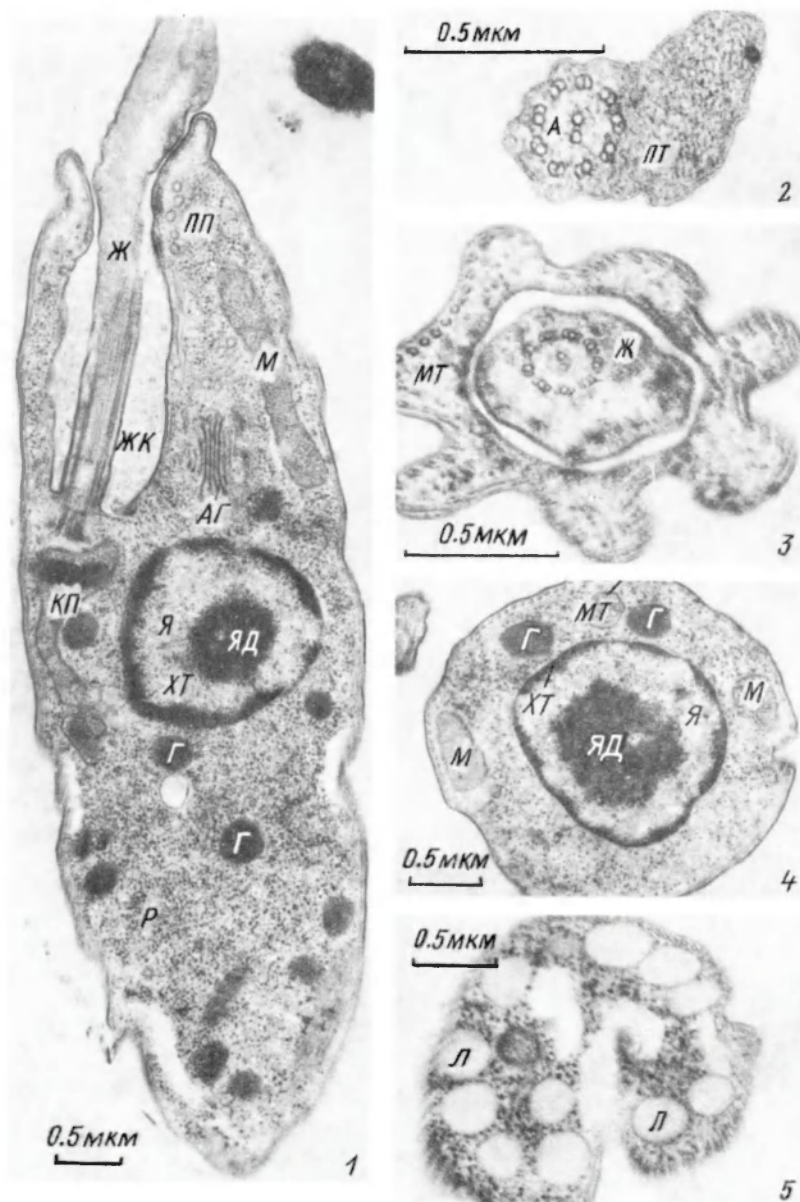


Рис. 2. Ультраструктура *L. mycophilus*.

1 — продольный срез через жгутиконосца; 2 — поперечный срез свободного жгутика; 3 — поперечный срез через апикальную часть клетки со жгутиком и жгутиковым карманом (ЖК); 4 — поперечный срез клетки на уровне ядра; 5 — липидные включения (Л) в задней части клетки; А — аксонема; АГ — аппарат Гольджи; Г — гликосомы; М — митохондрия; МТ — микротрубочки; ПП — пиноцитозные пузырьки, ПТ — параксиальный тяж; Р — рибосомы; ХТ — хроматин, ЯД — ядрышко.

Остальные обозначения, как на рис. 1.

Fig. 2. Ultrastructure of *L. mycophilus*.